

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.02.002

烟碱型乙酰胆碱受体在面神经支配的口轮匝肌和躯体神经支配的腓肠肌中的表达差异研究*

吴爽 黄勇 邢怡安 陈莲华[△] 李士通

(上海交通大学附属第一人民医院麻醉科 上海 201600)

摘要 目的: 研究烟碱型乙酰胆碱受体在面神经支配的口轮匝肌和躯体神经支配的腓肠肌运动终板处的表达差异及可能的原因。**方法:** 分离 SD 大鼠的口轮匝肌和腓肠肌,通过免疫共沉淀技术计算口轮匝肌和腓肠肌肌肉特异性激酶(Muscle Specific Kinase, MuSK)的表达以及 MuSK 磷酸化水平。对 MuSK 的上游信号通路中能使其发生磷酸化的集聚蛋白 Agrin、低密度脂蛋白受体相关蛋白 4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4, Lrp4) 以及表皮生长因子家族受体 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4(epidermal growth factor receptor)免疫荧光染色,计算这两条不同通路中的蛋白在运动终板处的表达水平。**结果:** 口轮匝肌中 MuSK 磷酸化水平显著高于腓肠肌($P<0.05$)。口轮匝肌与腓肠肌的运动终板处的 Agrin 和 Lrp4 表达没有显著差异($P>0.05$)。口轮匝肌 ErbB2、ErbB3、ErbB4 的表达显著高于其在腓肠肌运动终板处的表达($P<0.01$)。**结论:** 口轮匝肌和腓肠肌运动终板 ErbB、ErbB3、ErbB4 的差异表达造成 MuSK 磷酸化水平不同,可能是两种肌肉运动终板处烟碱型乙酰胆碱亚基表达量不同的原因。

关键词: 诱发肌电位;非去极化肌松药;肌肉特异性激酶;表皮生长因子受体

中图分类号: R-33; Q429.7; R745.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)02-209-05

A Study on the Different Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Facial Nerve Innervated Orbicularis Oris and the Somatic Nerve Innervated Gastrocnemius*

WU Shuang, HUANG Yong, XING Yi-an, CHEN Lian-hua[△], LI Shi-tong

(Department of anesthesiology, Shanghai general hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 201600, China)

ABSTRACT Objective: To study the different expression of nicotinic acetylcholine receptors in the orbicularis oris and gastrocnemius. **Methods:** Orbicularis oris and gastrocnemius were harvested from rats. The percentage of phosphorylated MuSK (Muscle Specific Kinase) was figured out by immunoprecipitation. Immunofluorescence was used to measure the expressions of Agrin, Lrp4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4) and epidermal growth factor receptor ErbB2, ErbB3, ErbB4, which can activate the phosphorylation of MuSK. **Results:** The percentage of phosphorylated MuSK in the orbicularis oris was higher than in the gastrocnemius ($P<0.05$). The expressions of Agrin, Lrp4 showed no difference in the orbicularis oris and gastrocnemius ($P>0.05$). ErbB2, ErbB3 and ErbB4 expressed differently in the orbicularis oris and gastrocnemius ($P<0.01$). **Conclusion:** The different expressions of ErbB2, ErbB3, ErbB4 result in different level of phosphorylated MuSK, which could contribute to the different expression of nicotinic acetylcholine receptors in the facial nerve innervated orbicularis oris and somatic nerve innervated gastrocnemius.

Key words: Evoked Electromyography; Nondepolarizing Muscular Relaxants; Muscle-Specific Kinase; ErbB

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q429.7; R745.12 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)02-209-05

前言

在耳颅底外科和神经外科头颈部手术中,诱发肌电位(Evoked Electromyography, EEMG)常常被用于探测面神经的位置和功能,可有效避免在术中损伤到面神经,降低医源性神经损伤的发生率^[1]。然而 EEMG 的使用与在全身麻醉期间为了禁止术中病人的体动而使用肌松药相矛盾,因为术中面神经的 EEMG 监测会受到肌松药会影响^[2]。我们既往的研究发现了面

神经支配的口轮匝肌对非去极化肌松药(Nondepolarizing Muscular Relaxants, NDMRs)的敏感性低于躯体神经支配的腓肠肌,即在相同浓度的非去极化肌松药罗库溴铵作用下,口轮匝肌肌肉收缩力被抑制的程度比腓肠肌低^[3,4],这种差异给部分神经肌肉阻滞(Partial Neuromuscular Blockade, PNMB)提供了可能。面神经支配的口轮匝肌的运动终板处 nAChRs (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs)的表达相对高于躯体神经支配的腓肠肌运动终板处的表达,这可能解释了两块肌肉对

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81271075);国家自然科学基金项目(81870714)

作者简介:吴爽(1994-),硕士研究生,主要研究方向:麻醉药理学,电话:15800391259, E-mail: wushuangsjtu@aliyun.com

[△] 通讯作者:陈莲华(1964-),博士生导师,教授,主要研究方向:麻醉药理学,电话:13301978757, E-mail: chenlianhua@aliyun.com

(收稿日期:2019-06-28 接受日期:2019-07-23)

NDMRS 敏感性的差异的原因^[5,9]。然而,nAChRs 在两种肌肉运动终板的表达差异的原因尚未知。

MuSK(肌肉特异性激酶)是一种酪氨酸激酶受体,对运动终板的形成和稳定有至关重要的作用^[7]。由运动神经元合成在运动终板释放的集聚蛋白(Agrin),是一种肝素硫酸酯类糖蛋白,通过与低密度脂蛋白相关受体 4(Lrp4)形成复合物,促进 MuSK 发生磷酸化,加速运动终板 nAChRs 亚基合成并聚集,最终促进运动终板成熟和稳定^[8-10]。敲除 Agrin,Lrp4,MuSK 基因的小鼠由于神经肌肉功能受损而在出生时死于呼吸功能障碍^[11-14]。神经调节蛋白 1/表皮生长因子家族酪氨酸激酶受体(Neuregulin1/ErbB)途径是另一种在运动终板处可调节 nAChRs 表达的信号通路。Neuregulin1 通过激活 ErbB,促进 MuSK 的磷酸化以增加运动终板处 nAChRs 亚基的表达和聚集^[15,16],对于维持运动终板的高 nAChRs 密度至关重要^[17,18],而且 Neuregulin1 杂合突变小鼠的突触后 nAChRs 密度显著降低^[19]。

为了研究 nAChRs 在两种肌肉中表达的差异的原因,本实验检测了两种肌肉中的 MuSK 蛋白的表达以及磷酸化水平,并探讨了其差异的可能原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为 25 只 180-220 g 的雄性 SD 大鼠,由上海市第一人民医院实验动物中心购买和饲养。

1.2 主要实验仪器和试剂

冰冻切片机(Leica);激光共聚焦显微镜(Leica);山羊抗 Agrin 抗体(R&D SYSTEMS, AF550);绵羊抗 Lrp4 抗体(R&D SYSTEMS AF5948);兔抗 MuSK 抗体(GenTex GTX25619);兔抗 ErbB2 抗体(Sigma SAB4300351);兔抗 ErbB3 抗体(Abcam ab32121);小鼠抗 ErbB4 抗体(Abcam ab19391);小鼠抗酪氨酸磷酸化抗体 4G10(Millipore 05-321);AlexaFluor594 标记的驴抗山羊二抗(Life Technologies A11058);AlexaFluor594 标记的驴抗绵羊二抗(Life Technologies A11016);AlexaFluor5 标记的驴抗兔二抗(Life Technologies A21207);AlexaFluor594 标记的驴抗小鼠

二抗(Life Technologies A21203);AlexaFluor488 α -bungarotoxin(Life Technologies B13422);RIPA buffer(Beyotime Biotechnology, Shanghai, China);琼脂糖磁珠(Protein A/G Magnetic Agarose Beads, Thermo Scientific)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集 采用 50 mg/kg 戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠后,取出左侧的口轮匝肌和腓肠肌,经过低温丙酮的固定后,放入 30%蔗糖脱水,然后液氮冻存标本用于免疫荧光;用于免疫共沉淀的标本取出后直接放入液氮中保存。

1.3.2 免疫共沉淀 研磨裂解肌肉组织后加入蛋白 A/G 琼脂糖磁珠 4℃摇晃 10 min 进行预清除然后离心去除蛋白 A/G 琼脂糖磁珠,接着在裂解液中加入抗 MuSK 的抗体,缓慢摇动 4℃过夜,以形成抗原抗体混合物。加入蛋白 A/G 琼脂糖串珠来捕捉抗原抗体复合物,离心收集沉淀并用细胞 IP 裂解液洗剂 3 次。加热使 A/G 琼脂糖串珠与抗原抗体复合物分离。使用 SDS-PAGE 电泳得到 MuSK 蛋白和磷酸化的 MuSK 的条带。

1.3.3 免疫荧光染色 使用冰冻切片机,切片厚度为 15 μ m。在 10%的驴血清封闭一小时后,分别用相应的 Agrin,Lrp4,MuSK 和 ErbB2,ErbB3,ErbB4 抗体 4℃孵育 12 h,PBS 洗后加入二抗(1:1000)并室温孵育 1 h,PBS 洗后封片,使用激光共聚焦显微镜拍照。

1.4 统计学分析

使用 Image-Pro Plus 软件计算荧光的 density 值和蛋白条带的 IOD 值。使用 Graph Pad Prism 7.0 软件统计和分析数据,口轮匝肌与腓肠肌蛋白表达水平比较采用非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 口轮匝肌和腓肠肌 MuSK 的磷酸化水平比较

利用免疫共沉淀技术,我们发现在 100 kD 条带的位置,MuSK 在两种肌肉中的表达并无差异。然而通过计算 4G10(磷酸化的 MuSK)条带的强度与 MuSK 条带强度的比值,得出口轮匝肌中 MuSK 磷酸化程度高于腓肠肌中 MuSK 磷酸化水平($63.7\% \pm 2.26\%$ vs $45.3\% \pm 3.27\%$, $P < 0.05$, $n=20$)。结果见图 1。

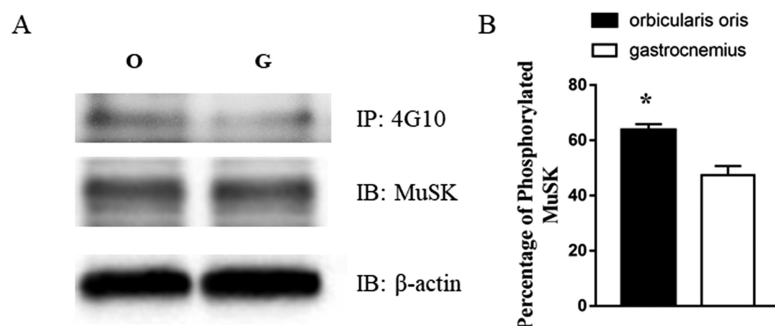


图 1 口轮匝肌和腓肠肌 MuSK 磷酸化水平比较

Fig.1 Immunoprecipitation of MuSK to detect the percentage of phosphorylated MuSK in orbicularis oris(O) and gastrocnemius(G)

2.2 口轮匝肌和腓肠肌中运动终板处 Agrin、Lrp4 和 MuSK 的表达比较

对腓肠肌和口轮匝肌运动终板处的 Agrin,Lrp4 和 MuSK 进行荧光染色。 α -BTX(α -bungarotoxin)是一种银环蛇毒素,可

以特异性结合 nAChRs 的 $\alpha 1$ 亚基,用于标记运动终板。Agrin 在口轮匝肌中运动终板的荧光密度(0.07959 ± 0.005334)与腓肠肌(0.08235 ± 0.004976)中差异无统计学意义($P > 0.05$, $n=20$),Lrp4 (0.04213 ± 0.002265 - 0.04122 ± 0.002043)和 MuSK (0.04829

$\pm 0.002214-0.04267 \pm 0.002098$) 也无显著差异 ($P>0.05$, $n=20$), 结果见图 2。

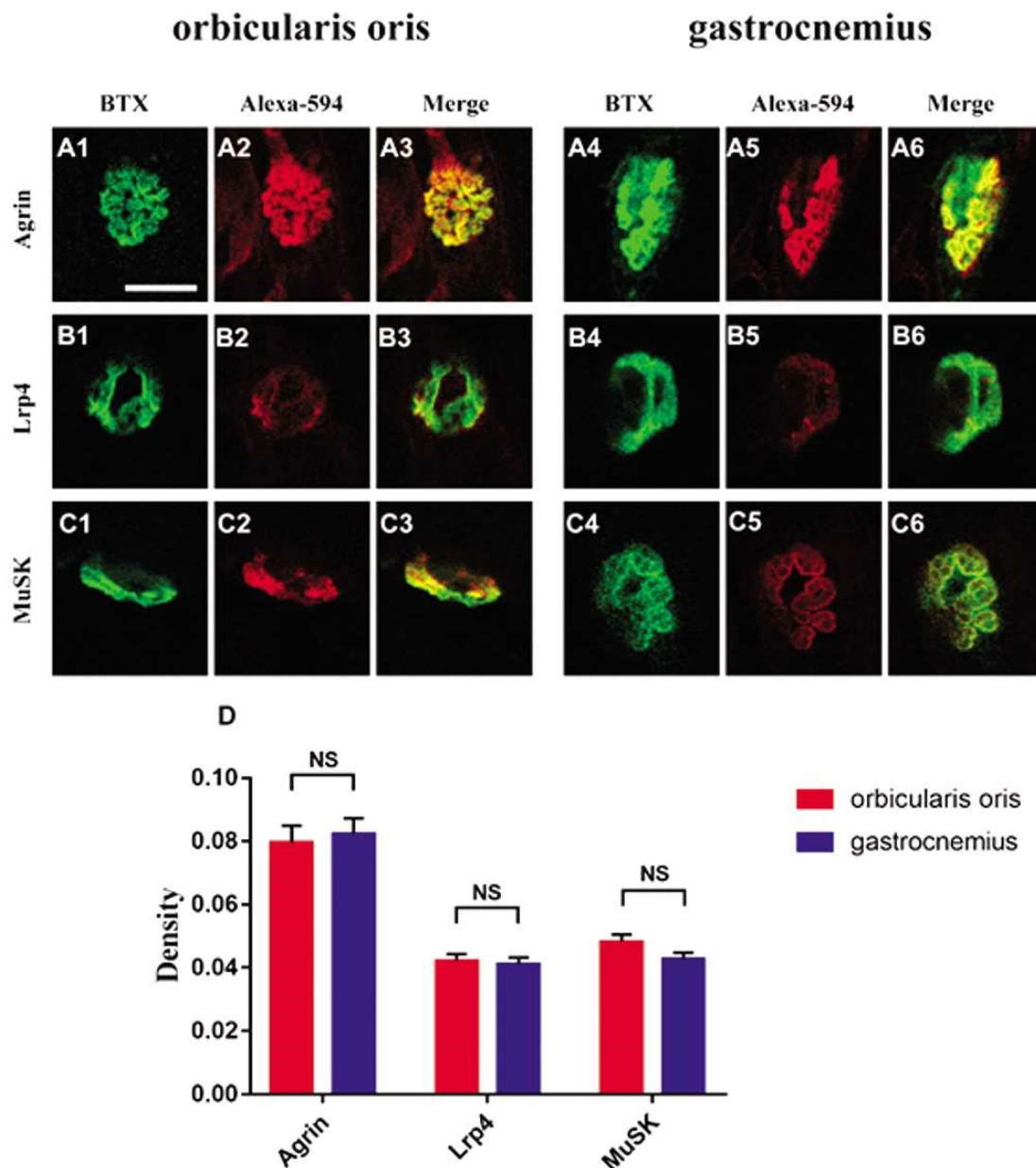


图 2 口轮匝肌和腓肠肌运动终板处 Agrin, LRP4 和 MuSK 的免疫荧光和其 Densities 统计分析

Fig. 2 Immunostaining for Agrin, Lrp4 and MuSK at the neuromuscular junction in the orbicularis oris and gastrocnemius (A-D)

No significant differences in the densities of the Agrin, Lrp4 and MuSK were observed in the orbicularis oris and gastrocnemius (E).

NS: No significance, Scale bar: 20 μ m

2.3 口轮匝肌和腓肠肌中运动终板处 ErbB2, ErbB3 和 ErbB4 的表达

Neuregulin1 蛋白的亚型数目众多, 所以我们没有对 Neuregulin1 染色而是选择了对其受体 ErbB2, ErbB3 和 ErbB4 进行荧光染色, 结果显示口轮匝肌运动终板处 ErbB2($0.07885 \pm 0.003437-0.06604 \pm 0.002352$)、ErbB3 ($0.06661 \pm 0.002334-0.05697 \pm 0.002484$)以及 ErbB4($0.08167 \pm 0.002525-0.07076 \pm 0.002359$) 的表达均显著高于其在腓肠肌运动终板处的表达 ($P<0.01$, $n=20$), 结果见图 3。

3 讨论

临床上使用 PNMB 技术, 一方面术者可以通过监测面神

经的 EEMG, 防止术中损伤到面神经; 另一方面 PNMB 也实现术中病人肌肉松弛的要求, 杜绝了术中病人的体动。在既往的研究中, 我们发现面神经支配的口轮匝肌对非去极化肌松药罗库溴铵的敏感性低于躯体神经支配的腓肠肌。为了探索这种敏感性差异的机制, 我们比较了 NDMRS 的作用靶点 nAChRs 在口轮匝肌与腓肠肌运动终板处的表达, 发现了口轮匝肌运动终板处有相对较高水平的 nAChRs 表达。

在胚胎发育过程中, 肌肉会预先选定运动终板位置, 并引导神经末梢的生长, 最终形成完整的突触的结构, 而表达于肌细胞膜上的 MuSK 蛋白在这一过程中起决定性的作用。在 MuSK 突变的肌管和小鼠胚胎中, 运动终板的突触前和突触后的正常结构都无法形成。MuSK 在体外培养的成肌细胞中

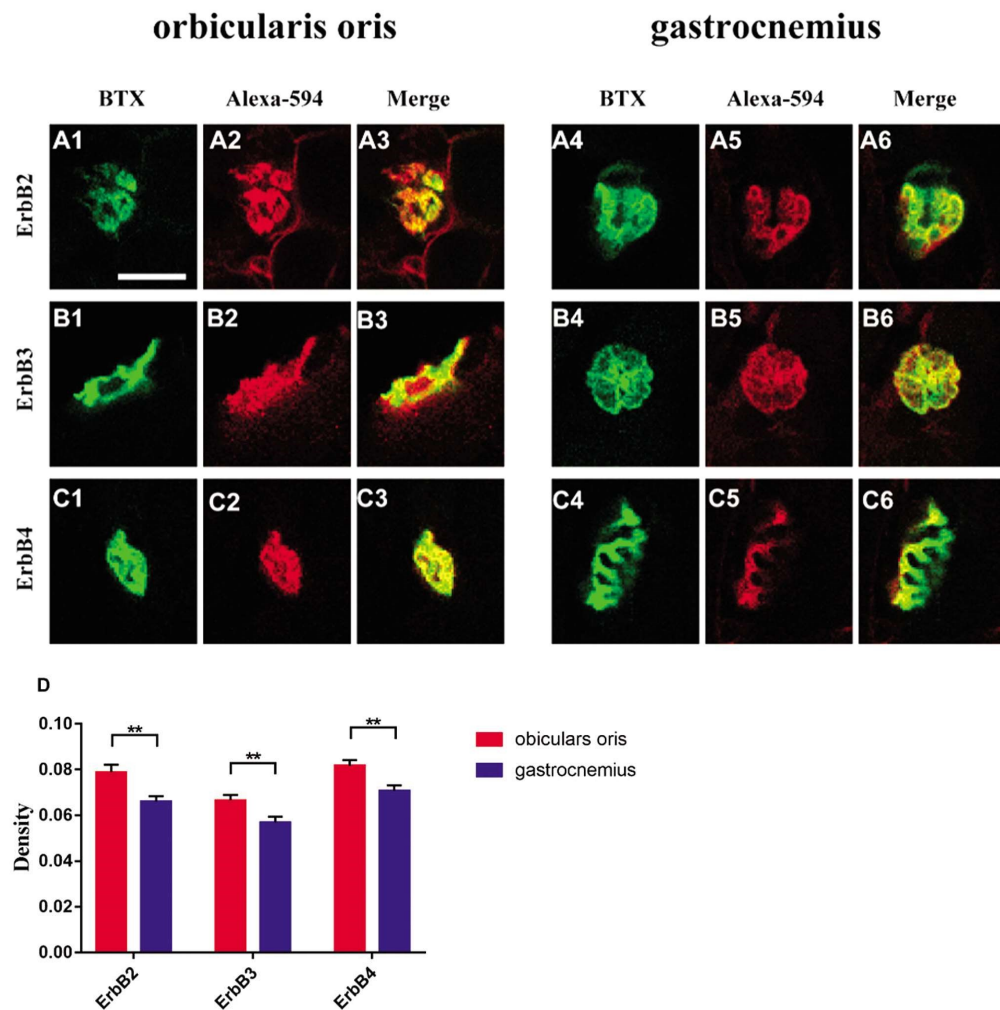


图3 口轮匝肌和腓肠肌运动终板处 ErbB2, ErbB3 和 ErbB4 通路的免疫荧和 Densities 统计分析。 ** $P<0.01$, 标尺: 20 μm

Fig. 3 Immunostaining for ErbB2, ErbB3, and ErbB4 at the neuromuscular junction in the orbicularis oris and gastrocnemius (A-C). The densities of ErbB2, ErbB3, and ErbB4 in the orbicularis oris were significantly higher than those in the gastrocnemius (D). Scale bar: 20 μm , ** $P<0.01$

以低水平表达,同时动物实验证明在胚胎早期,MuSK 特异性表达于发育中的肌肉,但 MuSK 的水平在成熟肌肉中却显著下降,仅在神经肌肉接头处的表达和分布^[20]。突触后膜 nAChRs 的形成和聚集是运动终板成熟的标志,这一过程和 MuSK 表达和被激活发生磷酸化息息相关^[21,22]。在 MuSK 基因敲除小鼠或从突变体提取和培养的肌管中,nAChRs 不能在运动终板处聚集,甚至失去了突触特异性 nAChRs 表达和转录能力。然而,MuSK 对于 nAChRs 聚集的能力依赖于其近膜区的酪氨酸磷酸化修饰,当特异性的抑制 MuSK 的这段近膜区的功能后,突触后膜失去了 nAChRs 表达和聚集的能力^[23,24]。为了探讨 nAChRs 在口轮匝肌和腓肠肌运动终板处的表达差异的原因,根据以上我们对 MuSK 在运动终板形成和成熟的中作用的认识,我们首先分析了口轮匝肌和腓肠肌运动终板的 MuSK 表达量,同时评估了 MuSK 的磷酸化水平。结果显示了在两种肌肉运动终板处的 MuSK 的表达水平没有差异,而 MuSK 的磷酸化水平有显著差异,提示 MuSK 在两种肌肉中被不同程度的激活。

为了寻找 MuSK 磷酸化水平的差异的原因,我们探究了能促使 MuSK 发生磷酸化的上游因子的表达水平。在运动终板处,由运动神经元分泌的 Agrin,是一种肝素硫酸酯类糖蛋白分子。Agrin 通过与突触后膜 Lrp4 结合,激活 MuSK 近膜区的

Y533 位的酪氨酸发生磷酸化,促进 MuSK 对 nAChR 在突触后膜表达和聚集的作用,最终实现突触后膜 nAChRs 的表达和聚集^[20,25,26]。失去 Agrin 和 Lrp4 的作用,突触后膜 MuSK 磷酸化的水平显著降低,而且突触后膜 nAChRs 的表达和聚集也被抑制^[27]。鉴于 Agrin 和 Lrp4 对 MuSK 有激活的作用,我们检测了口轮匝肌和腓肠肌运动终板处的 Agrin 和 Lrp4 的表达。然而,我们并没有发现这两种蛋白在口轮匝肌和腓肠肌运动终板的表达有显著差异,这说明了口轮匝肌运动终板处 MuSK 相对高的磷酸化水平的原因并不是来自 Agrin 和 Lrp4 的表达。

另一种由运动神经元分泌的生长分化因子 Neuregulin1,是一种含有表皮生长因子样片段的神经调节蛋白,促进运动终板的发育和成熟。表皮生长因子家族酪氨酸激酶受体(ErbB)是 Neuregulin1 作用的受体,运动终板的突触前膜和突触后膜都有 ErbB 的分布。Neuregulin1 可以通过激活运动终板处 ErbB2, ErbB3 和 ErbB4,增加突触后膜 nAChRs 的转录,突触后膜的 nAChRs 密度在 Neuregulin1 杂合突变小鼠中显著降低^[28]。此外 Neuregulin1/ ErbB 对突触后膜 nAChRs 聚集促进作用依赖 MuSK 磷酸化。体外给予 Neuregulin1 刺激会增加 MuSK 的磷酸化水平,而且在 MuSK 近膜区功能被抑制的肌管中,Neuregulin1 失去了促进 nAChRs 转录和聚集的作用^[29,30]。我

们的研究结果显示口轮匝肌运动终板处 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的表达水平显著高于腓肠肌,这说明 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的不同表达可能是口轮匝肌和腓肠肌运动终板处不同 MuSK 磷酸化水平的原因,而 MuSK 在这两种肌肉中被不同程度的激活造成了 nAChRs 在口轮匝肌中表达水平高于腓肠肌。

综上所述,口轮匝肌腓肠肌运动终板处 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的差异表达可能影响了两种肌肉中 MuSK 的磷酸化水平,进而造成了两种肌肉运动终板 nAChRs 的差异表达,最终 nAChRs 的这种分布差异导致了两种肌肉对 NDMRS 敏感性的差异。本研究解释了口轮匝肌和腓肠肌对 NDMRs 不同敏感性的原因,并为临床中 PNMB 的使用提供理论基础。

参考文献(References)

- [1] A Scibilia, G Raffa, V Rizzo, et al. Intraoperative Neurophysiological Monitoring in Spine Surgery: A Significant Tool for Neuronal Protection and Functional Restoration [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2017, 124: 263-270
- [2] M Hayashibe. Evoked Electromyographically Controlled Electrical Stimulation[J]. *Front Neurosci-Switz*, 2016, 10
- [3] J Tan, J Xu, Y Xing, et al. Effect of rocuronium on the level and mode of pre-synaptic acetylcholine release by facial and somatic nerves, and changes following facial nerve injury in rabbits [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 1479-1490
- [4] Y Xing, L Chen, S Li. Evoked electromyography to rocuronium in orbicularis oris and gastrocnemius in facial nerve injury in rabbits[J]. *J Surg Res*, 2013, 185: 198-205
- [5] R Y Zhou, J Xu, F L Chi, et al. Differences in sensitivity to rocuronium among orbicularis oris muscles innervated by normal or damaged facial nerves and gastrocnemius muscle innervated by somatic nerve in rats: combined morphological and functional analyses[J]. *Laryngoscope*, 2012, 122: 1831-1837
- [6] Y Huang, Y Xing, H Wang, et al. Differences in pharmacodynamic responses to rocuronium in normal or injured orbicularis oris are associated with expression of acetylcholine receptor subunits [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 3238
- [7] L Sabre, A Evoli, A R Punga. Cognitive dysfunction in mice with passively induced MuSK antibody seropositive myasthenia gravis[J]. *J Neurol Sci*, 2019, 399: 15-21
- [8] B Zhang, S Luo, Q Wang, et al. LRP4 serves as a coreceptor of agrin [J]. *Neuron*, 2008, 60: 285-297
- [9] Y Zong, R Jin. Structural mechanisms of the agrin-LRP4-MuSK signaling pathway in neuromuscular junction differentiation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70: 3077-3088
- [10] M Yan, Z Liu, E Fei, et al. Induction of Anti-agrin Antibodies Causes Myasthenia Gravis in Mice[J]. *Neuroscience*, 2018, 373: 113-121
- [11] V Wadwekar, R R Pillai, S Sesh, et al. Pregnancy-associated respiratory failure in muscle specific kinase congenital myasthenic syndrome[J]. *Muscle Nerve*, 2019
- [12] T Taetzsch, G Valdez. NMJ maintenance and repair in aging[J]. *Curr Opin Physiol*, 2018, 4: 57-64
- [13] K Zhao, C Shen, L Li, et al. Sarcoglycan Alpha Mitigates Neuromuscular Junction Decline in Aged Mice by Stabilizing LRP4 [J]. *J Neurosci*, 2018, 38: 8860-8873
- [14] R Ueta, T Tezuka, Y Izawa, et al. The carboxyl-terminal region of Dok-7 plays a key, but not essential, role in activation of muscle-specific receptor kinase MuSK and neuromuscular synapse formation[J]. *J Biochem*, 2017, 161: 269-277
- [15] G Ronchi, K Haastert-Talini, B E Fornasari, et al. The Neuregulin1/ ErbB system is selectively regulated during peripheral nerve degeneration and regeneration[J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 43: 351-364
- [16] L Liu, F Xie, K Wei, et al. Sepsis induced denervation-like changes at the neuromuscular junction[J]. *J Surg Res*, 2016, 200: 523-532
- [17] J Wang, F Song, J A Loeb. Neuregulin1 fine-tunes pre-, post-, and perisynaptic neuromuscular junction development[J]. *Dev Dyn*, 2017, 246: 368-380
- [18] A Casanovas, S Salvany, V Lahoz, et al. Neuregulin 1-ErbB module in C-bouton synapses on somatic motor neurons: molecular compartmentation and response to peripheral nerve injury[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40155
- [19] S Y Park, S Y Jang, Y K Shin, et al. The Scaffolding Protein, Grb2-associated Binder-1, in Skeletal Muscles and Terminal Schwann Cells Regulates Postnatal Neuromuscular Synapse Maturation[J]. *Exp Neurobiol*, 2017, 26: 141-150
- [20] G Handara, F J A Hetsch, R Jüttner, et al. The role of agrin, Lrp4 and MuSK during dendritic arborization and synaptogenesis in cultured embryonic CNS neurons[J]. *Dev Biol*, 2019, 445: 54-67
- [21] B Z Camurdanoglu, C Hrovat, G Durnberger, et al. MuSK Kinase Activity is Modulated By A Serine Phosphorylation Site in The Kinase Loop[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33583
- [22] S Mazhar, R Herbst. The formation of complex acetylcholine receptor clusters requires MuSK kinase activity and structural information from the MuSK extracellular domain[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2012, 49: 475-486
- [23] R Herbst, S J Burden. The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling[J]. *EMBO J*, 2000, 19: 67-77
- [24] G Durnberger, B Z Camurdanoglu, M Tomschik, et al. Global analysis of muscle-specific kinase signaling by quantitative phosphoproteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13: 1993-2003
- [25] Y Zong, B Zhang, S Gu, et al. Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling[J]. *Genes Dev*, 2012, 26: 247-258
- [26] A Barik, Y Lu, A Sathyamurthy, et al. LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance[J]. *J Neurosci*, 2014, 34: 13892-13905
- [27] T Tezuka, A Inoue, T Hoshi, et al. The MuSK activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 16556-16561
- [28] G C Chu, L M Moscoso, M X Sliwowski, et al. Regulation of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene by recombinant ARIA: an in vitro model for transsynaptic gene regulation [J]. *Neuron*, 1995, 14: 329-339
- [29] S T Ngo, R N Cole, N Sunn, et al. Neuregulin-1 potentiates agrin-induced acetylcholine receptor clustering through muscle-specific kinase phosphorylation[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125: 1531-1543
- [30] B Kravic, D Huraskin, A D Frick, et al. LAP proteins are localized at the post-synaptic membrane of neuromuscular junctions and appear to modulate synaptic morphology and transmission [J]. *J Neurochem*, 2016, 139: 381-395